



⑫

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

④⑤ Veröffentlichungstag der Patentschrift :
27.07.94 Patentblatt 94/30

⑤① Int. Cl.⁵ : **C12N 15/15, C12N 15/61,
C12N 1/38, C12P 1/00**

②① Anmeldenummer : **92106978.7**

②② Anmeldetag : **23.04.92**

⑤④ **Verbesserung der Ausbeute bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen.**

③⑩ Priorität : **26.04.91 DE 4113750**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung :
28.10.92 Patentblatt 92/44

④⑤ Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung :
27.07.94 Patentblatt 94/30

⑧④ Benannte Vertragsstaaten :
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE**

⑤⑥ Entgegenhaltungen :
**EP-A- 0 293 793
EP-A- 0 315 782
EP-A- 0 393 725
J. BIOL. CHEM. Bd. 265, Nr. 28, 1990, Seiten
16760 - 16766 G. BOWDEN ET AL. 'Folding and
aggregation of b-lactamase in the periplasmic
space of Escherichia coli'**

⑦③ Patentinhaber : **BOEHRINGER MANNHEIM
GMBH
D-68298 Mannheim (DE)**

⑦② Erfinder : **Glockshuber, Rudolf, Dr.
Am Ellbach 3
W-8411 Adlmannstein (DE)
Erfinder : Wunderlich, Martina
Nothhaftstrasse 5
W-8400 Regensburg (DE)
Erfinder : Skerra, Arne, Dr.
Cheruskerweg 6
W-6200 Wiesbaden (DE)
Erfinder : Rudolph, Rainer, Prof.Dr.
Färbergasse 17
W-8120 Weilheim (DE)**

⑦④ Vertreter : **Huber, Bernhard, Dipl.-Chem. et al
Patentanwälte
H. Weickmann, Dr. K. Fincke
F.A. Weickmann, B. Huber
Dr. H. Liska, Dr. J. Prechtel, Dr. B. Böhm
Postfach 86 08
20
D-81635 München (DE)**

Anmerkung : Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steigerung der Ausbildung der natürlichen Proteinkonformation bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen durch einen prokaryontischen Wirtsorganismus, der eine rekombinante DNA enthält, die für das sekretierte Protein kodiert.

Die Proteinsynthese oder Translation in prokaryontischen Mikroorganismen findet an den Ribosomen im Cytoplasma statt. Bei einer Expression von rekombinanter DNA in bakteriellen Wirtsorganismen ist es oft wünschenswert, daß das resultierende rekombinante Genprodukt bzw. Protein aus dem Cytoplasma durch die innere bakterielle Membran in den periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Membran sekretiert wird. Vom Periplasma können die sekretierten Proteine dann beispielsweise durch einen osmotischen Schock in das Nährmedium freigesetzt werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß bei Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen in der Regel keine korrekte Ausbildung der nativen bzw. natürlichen Konformation erfolgt, d.h. es entstehen Polypeptide mit einer falschen oder unvollständigen Ausbildung der Disulfidbrücken, die biologisch inaktiv sind.

Thiolreagenzien werden bei Verfahren zur in vitro Renaturierung von unlöslichen Proteinen eingesetzt, die bei Expression von rekombinanter DNA in prokaryontischen Zellen cytoplasmatisch als Inclusion Bodies entstehen. Von den Thiolreagenzien ist bekannt, daß sie in Anwesenheit von Luftsauerstoff rasch zu Disulfiden oxidiert werden.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Steigerung der Ausbildung der natürlichen Proteinkonformation bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen.

Insbesondere könnte eine Unterstützung der Ausbildung der nativen Proteinkonformation die teilweise recht aufwendige in vitro-Renaturierung der falsch disulfidverbrückten Proteine ersetzen.

Gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch ein Verfahren zur Steigerung der Ausbildung der natürlichen Proteinkonformation bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen durch einen prokaryontischen Wirtsorganismus, der eine rekombinante DNA enthält, die für das sekretierte Protein kodiert, worin man den Wirtsorganismus in einem geeigneten Nährmedium unter geeigneten Bedingungen für die Expression der rekombinanten DNA züchtet, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein Nährmedium mit einem Gehalt von 0,1 bis 20 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien verwendet.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren gelingt es überraschenderweise, durch Zusatz von Thiolreagenzien im Fermentationsmedium die Ausbeute an korrekt disulfidverbrückten Proteinen zu steigern. Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei allen Proteinen angewendet werden, die eine oder mehrere Disulfidbrücken enthalten. Insbesondere bei Bedarf an geringen Proteinmengen, z.B. bei der Produktion von Wachstumsfaktoren im mg-Maßstab (Nerve Growth Factor, Interleukine oder ähnliche Verbindungen) kann durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf eine in vitro-Renaturierung verzichtet werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren hat sich ein Nährmedium mit einem Gehalt von 0,1 bis 20 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien als geeignet erwiesen. Verwendet man ein Nährmedium mit einem Gehalt von weniger als 0,1 mmol/l an Thiolreagenzien, so wird keine nennenswerte Steigerung der Ausbildung der natürlichen Proteinkonformation gefunden. Die Obergrenze der Thiolkonzentration liegt etwa bei 20 mmol/l und manifestiert sich sowohl in einer deutlichen Abnahme der Ausbeuten an sekretiertem, funktionalem Protein als auch in einem starken Rückgang des Zellenwachstums. Vorzugsweise verwendet man das Nährmedium mit einem Gehalt von 1 bis 15 mmol/l und besonders bevorzugt mit einem Gehalt von 3 bis 12 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien. Bei Verwendung von Glutathion als Thiolreagenz haben sich etwa 5 mmol/l als optimale Konzentration erwiesen.

Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff "Thiolreagenz" bedeutet entweder ein reduzierendes Thiolreagenz mit SH-Gruppen oder ein Gemisch von reduzierenden Thiolreagenzien mit SH-Gruppen und oxidierenden Thiolreagenzien mit Disulfidgruppen.

Als reduzierende Thiolreagenzien sind insbesondere solche geeignet, die eine einzige SH-Gruppe pro Molekül aufweisen. Besonders bevorzugte Substanzen sind reduziertes Glutathion (GSH), Cystein, N-Acetylcystein, Cysteamin, β -Mercaptoethanol und ähnliche Verbindungen. Am meisten bevorzugt sind N-Acetylcystein und reduziertes Glutathion (GSH). Die Thiolreagenzien können sowohl einzeln als auch in Gemischen verwendet werden.

Obwohl die alleinige Verwendung reduzierender Thiolreagenzien im allgemeinen bevorzugt ist, bringt auch die Verwendung eines Gemisches von reduzierenden und oxidierenden Thiolreagenzien eine verbesserte Ausbeute an korrekt disulfidverbrückten Proteinen. Bei Verwendung eines derartigen Gemisches von reduzierenden und oxidierenden Thiolreagenzien beträgt das molare Verhältnis von reduzierenden zu oxidierenden Thiolreagenzien vorzugsweise 2:1 bis 20:1, besonders bevorzugt 5:1 bis 10:1. Ein Gemisch eines reduzierten und eines oxidierten Thiolreagenzes sind beispielsweise reduziertes Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG).

Ein Beispiel für das erfindungsgemäße Verfahren ist die heterologe Expression des bifunktionalen α -Amylase/Trypsin-Inhibitors aus *Eleusine coracana* Gaertneri (RBI) in *E.coli*. Der Inhibitor wurde von Shivaraj und Pattabiraman charakterisiert (Shivaraj B. & Pattabiraman, T.N., Indian J.Biochem.Biophys. 17 (1980), 181-193; Shivaraj B. & Pattabiraman, T.N., Biochem.J. 193 (1981), 29-36). Die Aminosäuresequenz des Inhibitors wurde von Campos und Richardson aufgeklärt (Campos, F.A.P. & Richardson, M., FEBS Letters 152 (1983), 300-304). Dieses Protein besteht aus 122 Aminosäuren, enthält 5 intramolekulare Disulfidbrücken und gehört einer neuen α -Amylase/Trypsin-Inhibitor-Klasse an (Halford et al., Biochim.Biophys.Acta 950 (1988), 435-440), wobei es deren einziger bifunktionaler Vertreter ist. An dieser Stelle soll jedoch angemerkt werden, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren auch auf die Gewinnung anderer disulfidverbrückter rekombinanter Proteine (z.B. Antikörperfragmente) in prokaryontischen Wirtsorganismen übertragen läßt, die sekretiert werden.

Zur Gewinnung des sekretorischen RBI-Proteins in funktionaler Form in *E.coli* wurde ein synthetisches RBI-Gen mit gentechnologischen Mitteln an die Signalsequenz des Outer Membrane Proteins A (OmpA) von *E.coli* fusioniert und die Fusion auf einem rekombinanten Plasmid unter Kontrolle eines lac-Promotors in *E.coli* exprimiert. Auf diese Weise wird die Polypeptidkette des rekombinanten Proteins ins Periplasma der prokaryontischen Wirtszelle transportiert, wo sie sich nach Abspaltung der Signalsequenz aufgrund der oxidierenden Eigenschaften dieses Zellkompartiments unter Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken zum nativen Protein falten kann. Bei dieser Faltung können jedoch nur geringe Mengen des funktionalen Proteins erhalten werden. Bei der erfindungsgemäßen Anwesenheit von Thiolreagenzien im Nährmedium gelingt es jedoch, die Ausbeute an funktionalem Protein erheblich (um den Faktor 5) zu steigern.

Der Wirtsorganismus für das erfindungsgemäße Verfahren ist ein prokaryontischer Wirtsorganismus. Vorzugsweise führt man die Expression des rekombinanten Proteins in einem gram-negativen prokaryontischen Wirtsorganismus, besonders bevorzugt in *E.coli* durch.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es im allgemeinen günstig, daß die für das sekretierte Protein kodierende rekombinante DNA in operativer Verknüpfung mit einem DNA-Fragment steht, das für ein Signalpeptid zum Durchdringen von inneren bakteriellen Membranen kodiert. Der Begriff "operative Verknüpfung" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, daß eine translationale Fusion zwischen dem heterologen Protein und dem Signalpeptid besteht. Dabei bildet das Signalpeptid üblicherweise den N-terminalen Anteil der translationalen Fusion. Die Art des Signalpeptids selbst ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch, abgesehen davon, daß es die Sekretion des rekombinanten Proteins ermöglichen soll. Eine große Anzahl derartiger Signalpeptide sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt. Eine Reihe von Signalpeptiden sind z.B. bei Winnacker (Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, Verlag Chemie Weinheim (1985), S. 256) aufgezählt. Wird das erfindungsgemäße Verfahren in *E.coli* als Wirtsorganismus durchgeführt, so hat sich das Signalpeptid aus dem *E.coli* OmpA-Protein als besonders geeignet erwiesen.

Für die Expression in einem prokaryontischen Wirtsorganismus muß die rekombinante DNA, welche für das sekretierte Protein kodiert, unter Kontrolle eines vom Transkriptionssystem des Wirts erkannten Expressionssignals bzw. Promotors stehen. Derartige, in prokaryontischen Wirtszellen aktive Expressionssignale sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt. Vorzugsweise wird für das erfindungsgemäße Verfahren ein induzierbares Expressionssignal verwendet. Beispiele für einen induzierbaren *E.coli*-Promotor sind der lac-Promotor, der durch Isopropyl- β -D-galactosid (IPTG) induzierbar ist, sowie synthetische Derivate des lac-Promotors (z.B. der tac- oder trc-Promotor).

Die rekombinante DNA, die für das disulfidverbrückte sekretierte Protein kodiert, wird im allgemeinen durch Transformation in die prokaryontische Wirtszelle eingeführt. Techniken zur Transformation verschiedener prokaryontischer Wirtsorganismen sind dem Fachmann bekannt und brauchen daher nicht im einzelnen genannt werden. Die in der transformierten Wirtszelle vorliegende rekombinante DNA befindet sich dabei üblicherweise auf einem rekombinanten Vektor, der in der Wirtszelle entweder extrachromosomal (z.B. Plasmid) oder im Genom der Wirtszelle integriert (z.B. Bakteriophage λ) vorliegen kann. Vorzugsweise wird als Vektor ein Plasmid verwendet. Dabei ist es für das erfindungsgemäße Verfahren nicht kritisch, welches spezielle Plasmid dabei als Expressionsvektor verwendet wird. Es kommt nur darauf an, daß die für das gewünschte Protein kodierende rekombinante DNA von der Wirtszelle in ausreichendem Maße transkribiert und translatiert werden kann. Das Translationsprodukt der rekombinanten DNA muß allerdings in einer Form vorliegen, die eine Sekretion durch die innere bakterielle Membran in das Periplasma erlaubt.

Wie oben ausgeführt, wird üblicherweise ein rekombinantes Protein, das mit einer Signalsequenz fusioniert ist, ins Periplasma einer prokaryontischen Wirtszelle transportiert. Dies stellt auch eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar. Bei Verwendung bestimmter Wirtsstämme erfolgt jedoch nicht nur eine Sekretion ins Periplasma, sondern auch eine massive Proteinsekretion in das Nährmedium. Die EP-A 0 338 410 offenbart *E.coli*-Stämme, die zu einer derartigen massiven Proteinsekretion in das Nährmedium in der Lage sind sowie ein Verfahren zur Herstellung derartiger Stämme. Als Ausgangsstämme für die Herstellung dieser Sekretormutanten werden vorzugsweise die in der EP-A 0 338 410 genannten *E.coli*-Stämme

DS410 (DSM 4513) bzw. BW7261 (DSM 5231) verwendet.

Als Nährmedium für das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise ein Vollmedium verwendet, insbesondere ein Medium, das Substanzen oder Substanzgemische aus Zellextrakten enthält. Ein Beispiel für ein solches Medium ist das LB-Medium, das Substanzgemische aus enzymatisch verdauten Zellextrakten (Bacto-Trypton und Yeast-Extract) enthält.

Der pH-Wert des Nährmediums liegt vorzugsweise in einem Bereich zwischen pH 5 und pH 9. Besonders bevorzugt liegt der pH-Wert des Nährmediums zwischen 6 und 8. Verwendet man LB-Medium als Nährmedium, so hat es sich als günstig erwiesen, einen pH-Wert von 7,4 bei der Herstellung des Mediums einzustellen. Während des Zellwachstums sinkt dann der pH-Wert des Mediums ab und liegt erfahrungsgemäß bei stationären Übernachtskulturen (Zeitpunkt der Zellernte) bei etwa 6,8.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise in einer Schüttelkultur in einem Vollmedium durchgeführt. Es ist jedoch auch möglich, die Wirtsorganismen in einem stark belüfteten Fermenter oder/und in Gegenwart eines Minimalmediums zu züchten.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man dem Nährmedium weiterhin ein oder mehrere Mono- oder/und Oligosaccharide zusetzt, die vom verwendeten prokaryontischen Wirtsorganismus nicht metabolisiert werden können. Aus einer Arbeit von Bowden und Georgiou (J.Biol. Chem. 265 (1990), 16760-16766) ist nämlich bekannt, daß der Zusatz von nicht metabolisierbaren Zuckern die Ausbildung der nativen Proteinkonformation fördern kann. Die zusätzliche Verwendung dieser nicht metabolisierbaren Zucker im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zeigt einen weiteren unterstützenden Effekt bei der Ausbildung der nativen Proteinkonformation von sekretierten Proteinen. Beispiele für nicht-metabolisierbare Zucker sind etwa Sorbose (ein Monosaccharid), Saccharose (ein Disaccharid) und Raffinose (ein Trisaccharid). Die Konzentration der nicht-metabolisierbaren Mono- oder/und Oligosaccharide im Nährmedium liegt für das erfindungsgemäße Verfahren günstigerweise zwischen 0,1 mol/l und 1 mol/l, vorzugsweise zwischen 0,3 mol/l und 0,7 mol/l.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man in einem Wirtsorganismus zusammen mit der Expression der für das zu sekretierende, disulfidverbrückte Protein kodierenden rekombinanten DNA eine Überexpression eines Proteindisulfidisomerasegens durchführt. Vorzugsweise verwendet man ein Proteindisulfidisomerasegen aus gram-negativen Bakterienspezies, besonders bevorzugt ein Proteindisulfidisomerasegen aus E.coli. Die DNA-Sequenz eines derartigen Gens ist in SEQ-ID NO: 3 gezeigt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß eine Coexpression und Cosekretion eines wirtseigenen Proteindisulfidisomerasegens in Kombination mit der Zugabe von Thiolreagenzien in das Nährmedium eine Ausbeuteerhöhung an funktionalem, sekretiertem Protein bewirkt, die über die alleinige Wirkung des Zusatzes von Thiolreagenzien noch hinausgeht. Dagegen hat die alleinige Coexpression von Proteindisulfidisomerase (PDI) ohne Zugabe von Thiolreagenzien keine Ausbeuteerhöhung zur Folge.

Der Begriff "Überexpression" gemäß vorliegender Erfindung bedeutet eine Steigerung der Proteindisulfidisomerase-Expression im Vergleich zu einem Wildtyp des jeweils verwendeten prokaryontischen Wirtsorganismus. Eine derartige Überexpression läßt sich beispielsweise dadurch erreichen, daß sich das Proteindisulfidisomerasegen unter Kontrolle eines starken, vorzugsweise induzierbaren Expressionssignals (z.B. eines lac-Promotors oder Derivaten davon) befindet. Vorzugsweise erfolgt die Überexpression des PDI-Gens in "operativer Verknüpfung" mit einem Signalpeptid zum Durchdringen innerer bakterieller Membranen. Besonders bevorzugt wird zu diesem Zweck die natürliche PDI-Signalsequenz verwendet.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann beispielsweise die für das zu sekretierende Protein kodierende rekombinante DNA und das Proteindisulfidisomerasegen auf einem einzigen Expressionsvektor in der Wirtszelle vorliegen. Dieser Expressionsvektor ist vorzugsweise ein extrachromosomaler Vektor, d.h. ein Plasmid, er kann jedoch auch integriert im Chromosom der Wirtszelle vorliegen (z.B. Lambda-Phage). Bei Verwendung eines einzigen Expressionsvektors ist es bevorzugt, daß sich die rekombinante DNA und das Proteindisulfidisomerasegen unter Kontrolle eines einzigen Expressionssignals, d.h. in Form eines dicistronischen Operons befinden.

Andererseits ist es jedoch möglich, daß sich die für das zu sekretierende Protein kodierende rekombinante DNA und das Proteindisulfidisomerasegen auf zwei miteinander kompatiblen extrachromosomalen Expressionsvektoren jeweils unter Kontrolle eines eigenen Expressionssignals (Promotors) befinden.

Die vorliegende Erfindung soll weiterhin durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abbildungen 1 und 2 sowie den SEQ ID NO: 1 - 5 verdeutlicht werden.

Abb. 1 zeigt einen Immunblot zum Nachweis von löslichem, prozessiertem RBI nach Zugabe unterschiedlicher Mengen von Glutathion ins Nährmedium.

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmids pRBla1-PDI.

SEQ ID NO:1 zeigt die DNA-Sequenz des zur Coexpression von RBI und der Proteindisulfidisomerase

(PDI) aus E.coli W3110 verwendeten Plasmids pRBl1-PDI.
 SEQ ID NO:2 zeigt die Sequenz des OmpA/RBI Gens. Die doppelsträngige DNA wird aus 14 synthetischen Oligonukleotiden zusammengesetzt und durch die Restriktionsschnittstellen XbaI und HindIII begrenzt. Der im Sequenzprotokoll gezeigte DNA-Strang ist aus 7 Oligonukleotiden zusammengesetzt, die folgenden Abschnitten entsprechen:

5

10

15

1 : Basen	2	-	62
2 : Basen	63	-	126
3 : Basen	127	-	195
4 : Basen	196	-	258
5 : Basen	259	-	322
6 : Basen	323	-	396
7 : Basen	397	-	455

20

Der Gegenstrang ist ebenfalls aus 7 Oligonukleotiden gebildet, die zu folgenden Abschnitten des gezeigten DNA-Stranges komplementär sind:

25

30

8 : Basen	6	-	68
9 : Basen	69	-	132
10: Basen	133	-	201
11: Basen	202	-	264
12: Basen	265	-	328
13: Basen	329	-	402
14: Basen	403	-	459.

SEQ ID NO: 3 zeigt die Sequenz des Proteindisulfidisomerasegens mit der natürlichen Signalsequenz und ribosomaler Bindungsstelle.
 SEQ ID NO: 4 zeigt den N-terminalen Primer zur Amplifizierung des PDI-Gens.
 SEQ ID NO: 5 zeigt den C-terminalen Primer zur Amplifizierung des PDI-Gens.

Beispiel 1

40

Gensynthese

Verbemerkung:

Molekulargenetische Techniken beruhen auf Maniatis et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Laboratory, New York), Oligonukleotide wurden nach dem Phosphoramiditverfahren (Sinha et al., Nucl.Acids Res. 12 (1984), 4539-4557; Kaplan, B.E., Trends Biotechnol.3 (1985), 253-256) auf einem automatischen Synthesegerät Typ 380A der Firma Applied Biosystems GmbH hergestellt.

Das synthetische Gen, das für die Fusion zwischen der OmpA-Signalsequenz und RBI kodiert, wurde aus 14 synthetischen Oligonukleotiden zusammengesetzt (SEQ ID NO: 2). Die Oligonukleotide wurden durch Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt und mit Ausnahme der beiden überstehenden Oligonukleotide am 5'- und am 3'-Ende des Gens jeweils an ihren 5'-Enden phosphoryliert. Danach wurden alle Oligonukleotide in äquimolaren Verhältnissen vereinigt und in einem einzigen Ansatz hybridisiert und ligiert. Das Gen wird durch die Restriktionsstellen XbaI und HindIII begrenzt. Die Aminosäuren der OmpA-Signalsequenz sind mit negativem Vorzeichen gekennzeichnet.

Beispiel 2

Konstruktion des Expressionsplasmids pRBla 1

Das nach Beispiel 1 erhaltene synthetische Gen wurde über die Restriktionsstellen XbaI und HindIII in das Expressionsplasmid pASK40 (Skerra et al., BIO/TECHNOLOGY 9 (1991), 273-278) kloniert. Die Sequenz des synthetischen Gens wurde durch Didesoxy-Sequenzierung überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pRBla1 bezeichnet.

Beispiel 3

10

Funktionale Expression von RBI im Periplasma von E.coli

Eine stationäre Übernachtskultur von E.coli JM83 (Yannish-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119), die mit pRBla1 transformiert worden war, wurde in Verhältnis 1:100 in 2,5 l LB-Medium (1 l LB-Medium enthält 10 g Bacto-Trypton (Difco Factories, Detroit, Michigan, USA), 5 g Yeast-Extrakt (Difco Factories) und 5 g NaCl, pH 7,4) mit Ampicillin (100 µg/ml) verdünnt und bei 26°C geschüttelt, bis eine OD₅₅₀ von 1,0 erreicht war. Danach wurde die Kultur in 9 identische 250 ml-Portionen unterteilt, jede Kultur mit IPTG (Isopropyl-β-D-galactosid; Endkonzentration 1 mmol/l) induziert, jedoch mit unterschiedlichen Mengen Glutathion (GSH) versetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 26°C weitergeschüttelt und durch Zentrifugation geerntet (Sorvall SS34, 4°C, 5000 Upm, 15 Minuten). Danach wurden die Zellen bei 4°C in 100 mmol/l Tris/HCl pH 7,5, 20 mmol/l Na-EDTA aufgenommen, so daß Zelldichten von jeweils 200 (OD₅₅₀) erhalten wurden. Die Zellen wurden darauf in einer French Pressure-Zellpresse (Aminco) bei 18000 PSI lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (Sorvall SS34, 4°C, 15000 Upm, 30 Minuten) und die löslichen Überstände auf ihren Gehalt an löslichem, funktionalem RBI untersucht.

Jeweils 5 µl der erhaltenen löslichen Überstände wurden auf einem 15 %igen Polyacrylamid/SDS-Gel aufgetrennt (Fling & Gregerson, Anal.Biochem. 155 (1986) 83-88). Die aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die RBI-Banden mit Hilfe eines Anti-RBI-Kaninchenantikörpers immunspezifisch gefärbt. Das Immunblotting wurde nach Blake et al., Anal.Biochem. 136 (1984), 175-179 durchgeführt.

Abb. 1 zeigt eine Analyse der Expressionsausbeuten an löslichem RBI durch Immunblotting. Spur 1 stellt einen Molekulargewichtsstandard dar. In Spur 2 wurden 0,8 µg RBI, gereinigt aus *Eleusine coracana* Gaertneri aufgetragen. Auf den Spuren 3 bis 6 wurden äquivalente Mengen der Zellextrakte mit unterschiedlichen Zugabemengen an Glutathion aufgetragen. In Spur 3 erfolgte keine GSH-Zugabe zum Kulturmedium. In Spuren 4, 5 und 6 wurden dem Kulturmedium 1 mmol/l, 5 mmol/l bzw. 10 mmol/l GSH zugesetzt.

Als Antikörper wurde ein polyklonales Anti-RBI-Antiserum verwendet, das nach Standardmethoden (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Kapitel 18) durch zweimalige Immunisierung eines Neuseelandkaninchens mit gereinigtem RBI aus *Eleusine coracana* Gaertneri hergestellt wurde.

Aus der Abbildung geht hervor, daß der Zusatz von GSH die Intensität der immunspezifisch angefärbten Bande verstärkt. Dies ist insbesondere bei Konzentrationen von 5 mmol/l und 10 mmol/l GSH ersichtlich.

Durch Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber Trypsin aus Rinderpankreas wurde die RBI-Menge in den löslichen Anteilen der erhaltenen Zellextrakte quantitativ bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die Menge an intrazellulärem, funktionalem Inhibitor bis zum 5-fachen gegenüber der Expression ohne die beschriebenen Mediumzusätze gesteigert werden kann (Tabelle 1).

Ferner ist aus Tabelle 1 ersichtlich, daß auch durch Zusatz eines Gemisches von reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) eine Verbesserung der Ausbeute an funktionalem Inhibitor erhalten wird.

Bei allen durchgeführten Tests wurden 5 µg Trypsin aus Rinderpankreas in 1 ml 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris/HCl pH 8,0, 10 mmol/l CaCl₂, 0,005 % (v/v) Triton X-100 mit der zu bestimmenden Menge an RBI 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 10 mmol/l N-α-Benzoyl-L-arginin-4-nitranilid (chromogenes Testsubstrat) wurde die Restaktivität des Trypsins durch Registrierung der zeitlichen Zunahme der Absorption bei 405 nm bestimmt. Die Inhibitorkonzentration im Test wurde aus der Differenz zwischen der Aktivität des freien Enzyms (ohne Zugabe des Inhibitors) und der jeweils gemessenen Restaktivität ermittelt.

Tabelle 1 zeigt die Expressionssteigerung von funktionalem RBI durch Zusatz von GSH bzw. eines Gemisches aus GSH und GSSG.

55

Tabelle 1

	mg / l . OD*	relative Zunahme	mg/l*	relative Zunahme
ohne GSH	0,07	1,0	0,36	1,0
5 mmol/l GSH	0,37	5,3	1,65	4,6
10 mmol/l GSH	0,34	4,9	1,38	3,8
5 mmol/l GSH +				
1 mol/l GSSG	0,25	3,9	1,18	2,7

* Die Ausbeuten an intrazellulärem, funktionalem RBI sind in mg / l . OD (Liter x optische Dichte), die Volumenausbeuten in mg/l angegeben.

Beispiel 4

Verwendung von N-Acetyl-L-Cystein als weiteres Thiolreagenz

Wie im Beispiel 3 beschrieben, werden Kulturen von E.coli JM83, die mit dem Plasmid pRBla1 transformiert worden waren, bei 26°C im LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) vermehrt und bei einer OD₅₅₀ = 1 mit IPTG (Endkonzentration: 1 mmol/l) induziert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von N-Acetyl-L-Cystein in fester form (Endkonzentration: 5 und 10 mmol/l). Die Kulturen wurden dann über Nacht weitergeschüttelt und, wie in Beispiel 3 beschrieben, durch Trypsin-Inhibitionstests auf ihren Gehalt an funktionalem RBI untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt und zeigen, daß der Konzentrationsbereich, in dem das N-Acetyl-L-Cystein wirkt, dem des reduzierenden Glutathions sehr ähnlich ist.

Tabelle 2

Expression von funktionalem RBI durch Zusatz von N-Acetyl-
Cystein

Zusatz im Medium	mg/l·OD*	relative Zunahme	mg/l*	relative Zunahme
ohne Zusatz 5 mmol/l	0,07	1,0	0,36	1,0
N-Acetyl-Cystein 10 mmol/l	0,31	4,4	1,27	3,5
N-Acetyl-Cystein 5 mmol/l GSH	0,25	3,6	0,83	2,3
	0,37	5,3	1,65	4,6

* Die Ausbeuten an intrazellulärem, funktionalem RBI sind in mg/l·OD, die Volumenausbeuten in mg/l angegeben. Die Bestimmung der RBI-Aktivität erfolgte durch Trypsin-Inhibitions-tests im löslichen Teil des Gesamtzellextrakts (vgl. Beispiel 3).

Beispiel 5

Coexpression und Cosekretion von periplasmatischer Proteindisulfidisomerase (PDI) und gleichzeitige Zugabe von Thiolreagenzien ins Kulturmedium

Zur Coexpression der wirtseigenen, periplasmatischen Proteindisulfidisomerase (PDI) wurde zunächst das PDI-Gen aus dem Genom des Ecoli K12 Wildtypstamms W3110 (Bachmann, B.J. (1972), Bacteriol.Rev. 36, 525-557) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei diente die bekannte Basensequenz des Gens (Bardwell, J.C.A., McGovern, K. & Beckwith, J., "Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation in vivo", Cell, 67, (1991), 581-589) als Ausgangspunkt für die Planung der entsprechenden Oligonukleotidprimer.

Zur Amplifizierung des PDI-Gens wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet:

N-terminaler Primer: (SEQ ID NO: 4)

5' TTGCAATTAACAAAGCTTGAATTCTCGGAGAGAGTAGATCATGAAAAAGAT 3'

C-terminaler Primer: (SEQ ID NO: 5)

5' GGGCTTTATGTAAAGCTTGGATCCTTATTTTCTCGGACAGATATTTTC 3'

Das amplifizierte DNA-Fragment, das das komplette Gen der PDI inklusive Signalsequenz und ribosomaler Bindungsstelle enthält, wurde isoliert und mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI geschnitten. Das Plasmid pRBIa1 wurde mit denselben Enzymen verdaut, das Vektorfragment isoliert und mit dem PDI-Gen ligiert. Das resultierende Plasmid pRBIa1-PDI enthält die Gene für OmpA/RBI und PDI als dicistronisches Operon unter der Kontrolle des lac-Promotors (Abb. 2). Die vollständige Nukleotidsequenz des Plasmids ist in SEQ ID NO: 1 dokumentiert.

Zur Analyse des Effekts der Coexpression und Cosekretion von PDI wurde E.coli JM83 mit dem Plasmid pRBI-PDI transformiert.

Die Anzucht und die Bestimmung der gebildeten intrazellulären RBI-Mengen erfolgte wie in den Beispielen

3 und 4 beschrieben. Die Analyse ergab, daß die Coexpression und Cosekretion von PDI nur bei gleichzeitiger Zugabe von reduziertem Glutathion zu einer Ausbeutesteigerung führt, die erheblich über der bei alleiniger Zugabe von Glutathion beobachteten Ausbeutesteigerung liegt, während die alleinige Expression von PDI überhaupt keinen Effekt auf die Menge an funktionalem, periplasmatischem RBI hat (Tabelle 3).

Tabelle 3

Expressionssteigerung von funktionalem RBI durch Koexpression von PDI aus E.coli

Zusatz im Medium	mg/l·OD*	relative Zunahme	mg/l*	relative Zunahme
ohne Zusatz	0,08	1,0	0,38	1,0
5 mmol/l GSH	0,37	4,6	1,65	4,3
PDI	0,08	1,0	0,39	1,0
PDI + 1 mM GSH	0,42	6,0	1,71	4,4
PDI + 5 mM GSH	0,97	13,7	4,33	11,1
PDI + 10 mM GSH	0,54	7,7	2,17	5,6
PDI + 1 mM GSH + 0,5 mM GSSG	0,38	5,4	2,00	5,1
PDI + 5 mM GSH + 0,5 mM GSSG	0,60	8,6	2,54	6,5
PDI + 10 mM GSH + 0,5 mM GSSG	0,46	6,6	1,93	4,9
PDI + 0,5 mM GSSG	0,10	1,4	0,57	1,5

* Die Ausbeuten an intrazellulärem, funktionalem RBI sind in mg/l·OD, die Volumenausbeuten in mg/l angegeben. Die Bestimmung der RBI-Aktivität erfolgte durch Trypsin-Inhibitionstests im löslichen Teil des Gesamtzellextrakts (vgl. Beispiel 3).

5

SEQUENZPROTOKOLL

SEQ ID NO:1:

10

LÄNGE: 4690 Basenpaare
 TYP: Nukleinsäure mit korrespondierendem Protein
 STRANGFORM: Doppelstrang
 TOPOLOGIE: zirkulär

15

NAME: Signalpeptid OmpA
 POSITION: 1328..1391

NAME: reifes Peptid RBI
 POSITION: 1392..1756

20

NAME: Signalpeptid
 POSITION: 1789..1845

NAME: reifes Peptid PDI
 POSITION: 1846..2412

	ACCCGACACC ATCGAATGGC GCAAAACCTT TCGCGGTATG GCATGATAGC GCCCGGAAGA	60
25	GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA TACGATGTCG CAGAGTATGC	120
	CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTTCCCGCGT GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA	180
	AACGCGGGAA AAAGTGAAG CGGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTCCCA ACCGCGTGGC	240
30	ACAACAACCTG GCGGGCAAAC AGTCGTTGCT GATTGGCGTT GCCACCTCCA GTCTGGCCCT	300
	GCACGCGCCG TCGCAAATTG TCGCGGCGAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC TGGGTGCCAG	360
	CGTGGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC TGTAAAGCGG CGGTGCACAA	420
	TCTTCTCGCG CAACGCGTCA GTGGGCTGAT CATTAACAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC	480
35	CATTGCTGTG GAAGCTGCCT GCACTAATGT TCCGGCGTTA TTTCTTGATG TCTCTGACCA	540
	GACACCCATC AACAGTATTA TTTTCTCCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG GCGTGGAGCA	600
	TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTTAGCG GGCCCATTA GTTCTGTCTC	660
40	GGCGCGTCTG CGTCTGGCTG GCTGGCATAA ATATCTCACT CGCAATCAAA TTCAGCCGAT	720
	AGCGGAACGG GAAGGCGACT GGAGTGCCAT GTCCGGTTTT CAACAAACCA TGCAAATGCT	780
	GAATGAGGGC ATCGTTCCCA CTGCGATGCT GGTGCGCAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC	840
45	AATGCGCGCC ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGCG GATATCTCGG TAGTGGGATA	900
	CGACGATACC GAAGACAGCT CATGTTATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA AACAGGATTT	960
	TCGCCTGCTG GGGCAAACCA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT	1020
50	GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT GGTGAAAAGA AAAACCACCC TGGCGCCCAA	1080

55

5	TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT	1140
	TTCCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT	1200
10	AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG	1260
	GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGAATTTCTA GATAACGAGG	1320
	GCAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCC GGC	1369
	Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly	
	-21 -20 -15 -10	
15	TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC TCT GTT GGT ACC TCT TGC ATC CCG GGT	1417
	Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ser Val Gly Thr Ser Cys Ile Pro Gly	
	-5 1 5	
	ATG GCT ATC CCG CAC AAC CCA CTG GAC TCT TGT AGA TGG TAT GTG TCG	1465
20	Met Ala Ile Pro His Asn Pro Leu Asp Ser Cys Arg Trp Tyr Val Ser	
	10 15 20 25	
	ACC CGC ACC TGC GGG GTT GGC CCT AGA CTG GCT ACT CAA GAA ATG AAA	1513
	Thr Arg Thr Cys Gly Val Gly Pro Arg Leu Ala Thr Gln Glu Met Lys	
	30 35 40	
25	GCT CGT TGC TGC CGT CAG CTC GAG GCT ATC CCG GCG TAC TGT CGT TGC	1561
	Ala Arg Cys Cys Arg Gln Leu Glu Ala Ile Pro Ala Tyr Cys Arg Cys	
	45 50 55	
	GAA GCT GTT CGT ATC CTG ATG GAC GGT GTT GTG ACG TCT TCT GGT CAG	1609
	Glu Ala Val Arg Ile Leu Met Asp Gly Val Val Thr Ser Ser Gly Gln	
30	60 65 70	
	CAC GAA GGT CGT CTC CTG CAG GAT CTC CCA GGT TGC CCG CGT CAG GTA	1657
	His Glu Gly Arg Leu Leu Gln Asp Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gln Val	
	75 80 85	
35	CAG CGT GCT TTC GCT CCG AAA CTG GTT ACT GAA GTT GAA TGC AAC CTG	1705
	Gln Arg Ala Phe Ala Pro Lys Leu Val Thr Glu Val Glu Cys Asn Leu	
	90 95 100 105	
	GCG ACT ATC CAT GGT GGC CCG TTC TGC CTG TCT CTG CTG GGT GCT GGT	1753
	Ala Thr Ile His Gly Gly Pro Phe Cys Leu Ser Leu Leu Gly Ala Gly	
	110 115 120	
40	GAA TGATAAGCTT GAATTCTCGG AGAGAGTAGA TC ATG AAA AAG ATT TGG CTG	1806
	Glu Met Lys Lys Ile Trp Leu	
	-19 -15	
	GCG CTG GCT GGT TTA GTT TTA GCG TTT AGC GCA TCG GCG GCG CAG TAT	1854
45	Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser Ala Ser Ala Ala Gln Tyr	
	-10 -5 1	
	GAA GAT GGT AAA CAG TAC ACT ACC CTG GAA AAA CCG GTA GCT GGC GCG	1902
	Glu Asp Gly Lys Gln Tyr Thr Thr Leu Glu Lys Pro Val Ala Gly Ala	
	5 10 15	
50		
55		

5	CCG CAA GTG CTG GAG TTT TTC TCT TTC TTC TGC CCG CAC TGC TAT CAG Pro Gln Val Leu Glu Phe Phe Ser Phe Phe Cys Pro His Cys Tyr Gln 20 25 30 35	1950
10	TTT GAA GAA GTT CTG CAT ATT TCT GAT AAT GTG AAG AAA AAA CTG CCG Phe Glu Glu Val Leu His Ile Ser Asp Asn Val Lys Lys Lys Leu Pro 40 45 50	1998
15	GAA GGC GTG AAG ATG ACT AAA TAC CAC GTC AAC TTC ATG GGT GGT GAC Glu Gly Val Lys Met Thr Lys Tyr His Val Asn Phe Met Gly Gly Asp 55 60 65	2046
	CTG GGC AAA GAT CTG ACT CAG GCA TGG GCT GTG GCG ATG GCG CTG GGC Leu Gly Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Ala Val Ala Met Ala Leu Gly 70 75 80	2094
20	GTG GAA GAC AAA GTG ACT GTT CCG CTG TTT GAA GGC GTA CAG AAA ACC Val Glu Asp Lys Val Thr Val Pro Leu Phe Glu Gly Val Gln Lys Thr 85 90 95	2142
25	AG ACC ATT CGT TCT GCT TCT GAT ATC CGC GAT GTA TTT ATC AAC GCA Gln Thr Ile Arg Ser Ala Ser Asp Ile Arg Asp Val Phe Ile Asn Ala 100 105 110 115	2190
	GGT ATT AAA GGT GAA GAG TAC GAC GCG GCG TGG AAC AGC TTC GTG GTG Gly Ile Lys Gly Glu Glu Tyr Asp Ala Ala Trp Asn Ser Phe Val Val 120 125 130	2238
30	AAA TCT CTG GTC GCT CAG CAG GAA AAA GCT GCA GCT GAC GTG CAA TTG Lys Ser Leu Val Ala Gln Gln Glu Lys Ala Ala Ala Asp Val Gln Leu 135 140 145	2286
	CGT GGC GTT CCG GCG ATG TTT GTT AAC GGT AAA TAT CAG CTG AAT CCG Arg Gly Val Pro Ala Met Phe Val Asn Gly Lys Tyr Gln Leu Asn Pro 150 155 160	2334
35	CAG GGT ATG GAT ACC AGC AAT ATG GAT GTT TTT GTT CAG CAG TAT GCT Gln Gly Met Asp Thr Ser Asn Met Asp Val Phe Val Gln Gln Tyr Ala 165 170 175	2382
40	GAT ACA GTG AAA TAT CTG TCC GAG AAA AAA TAAGGATCCC CACGCGCCCT Asp Thr Val Lys Tyr Leu Ser Glu Lys Lys 180 185	2432
	GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTGCGCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGCA TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGTTT CCGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTT CCGCTATTGG TTAATAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT	2492
45		2552
		2612
		2672
		2732
		2792
50		2852

5	TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA	2912
10	CCCCATATTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC	2972
	CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG	3032
	TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC	3092
15	TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTAC ATCGAACTGG	3152
	ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA	3212
	GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC	3272
	AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG	3332
20	AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA	3392
	GTGATAACAC TCGGGCCAAC TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG	3452
	CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA	3512
25	ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGTAGCAATG GCAACAACGT	3572
	TGCGCAAACT ATTAACGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT	3632
	GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT	3692
30	TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG	3752
	GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA	3812
	TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC	3872
	TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATT AAAACTTCAT TTTTAATTTA	3932
35	AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT	3992
	TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT	4052
	TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAA CAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT	4112
40	GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC	4172
	AGATACCAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG	4232
	TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG	4292
45	ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT	4352
	CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC	4412
	TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG	4472
50	ACAGGTATCC GGTAAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCAGGGG	4532

EP 0 510 658 B1

GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT 4592
TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT 4652
5 TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATG 4690

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

SEQ ID NO:2:

LÄNGE: 460 Basenpaare

TYP: Nukleinsäure mit korrespondierendem Protein

10

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

NAME: Signalpeptid

POSITION: 22..85

15

NAME: Signalpeptide

POSITION: 86..451

	TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG	51
	Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val	
	-21 -20 -15	
20	GCA CTG GCC GGC TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC TCT GTT GGT ACC TCT	99
	Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ser Val Gly Thr Ser	
	-10 -5 1 5	
	TGC ATC CCG GGT ATG GCT ATC CCG CAC AAC CCA CTG GAC TCT TGT AGA	147
	Cys Ile Pro Gly Met Ala Ile Pro His Asn Pro Leu Asp Ser Cys Arg	
	10 15 20	
25	TGG TAT GTG TCG ACC CGC ACC TGC GGG GTT GGC CCT AGA CTG GCT ACT	195
	Trp Tyr Val Ser Thr Arg Thr Cys Gly Val Gly Pro Arg Leu Ala Thr	
	25 30 35	
	CAA GAA ATG AAA GCT CGT TGC TGC CGT CAG CTC GAG GCT ATC CCG GCG	243
30	Gln Glu Met Lys Ala Arg Cys Cys Arg Gln Leu Glu Ala Ile Pro Ala	
	40 45 50	
	TAC TGT CGT TGC GAA GCT GTT CGT ATC CTG ATG GAC GGT GTT GTG ACG	291
	Tyr Cys Arg Cys Glu Ala Val Arg Ile Leu Met Asp Gly Val Val Thr	
	55 60 65	
35	TCT TCT GGT CAG CAC GAA GGT CGT CTC CTG CAG GAT CTC CCA GGT TGC	339
	Ser Ser Gly Gln His Glu Gly Arg Leu Leu Gln Asp Leu Pro Gly Cys	
	70 75 80 85	
	CCG CGT CAG GTA CAG CGT GCT TTC GCT CCG AAA CTG GTT ACT GAA GTT	387
40	Pro Arg Gln Val Gln Arg Ala Phe Ala Pro Lys Leu Val Thr Glu Val	
	90 95 100	
	GAA TGC AAC CTG GCG ACT ATC CAT GGT GGC CCG TTC TGC CTG TCT CTG	435
	Glu Cys Asn Leu Ala Thr Ile His Gly Gly Pro Phe Cys Leu Ser Leu	
	105 110 115	
45	CTG GGT GCT GGT GAA T GATAAGCTT	460
	Leu Gly Ala Gly Glu	
	120	

50

55

5

SEQ ID NO:3:

10 LÄNGE: 639 Basenpaare
 TYP: Nukleinsäure mit korrespondierendem Protein
 STRANGFORM: Doppelstrang
 TOPOLOGIE: linear

NAME: Signalpeptid
 POSITION: 16..72

15 NAME: Signalpeptid
 POSITION: 73..639

	CGGAGAGAGT AGATC ATG AAA AAG ATT TGG CTG GCG CTG GCT GGT TTA GTT	51
	Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val	
	-19 -15 -10	
20	TTA GCG TTT AGC GCA TCG GCG GCG CAG TAT GAA GAT GGT AAA CAG TAC	99
	Leu Ala Phe Ser Ala Ser Ala Ala Gln Tyr Glu Asp Gly Lys Gln Tyr	
	-5 1 5	
	ACT ACC CTG GAA AAA CCG GTA GCT GGC GCG CCG CAA GTG CTG GAG TTT	147
25	Thr Thr Leu Glu Lys Pro Val Ala Gly Ala Pro Gln Val Leu Glu Phe	
	10 15 20 25	
	TTC TCT TTC TTC TGC CCG CAC TGC TAT CAG TTT GAA GAA GTT CTG CAT	195
	Phe Ser Phe Phe Cys Pro His Cys Tyr Gln Phe Glu Glu Val Leu His	
	30 35 40	
30	ATT TCT GAT AAT GTG AAG AAA AAA CTG CCG GAA GGC GTG AAG ATG ACT	243
	Ile Ser Asp Asn Val Lys Lys Lys Leu Pro Glu Gly Val Lys Met Thr	
	45 50 55	
	AAA TAC CAC GTC AAC TTC ATG GGT GGT GAC CTG GGC AAA GAT CTG ACT	291
35	Lys Tyr His Val Asn Phe Met Gly Gly Asp Leu Gly Lys Asp Leu Thr	
	60 65 70	
	JAG GCA TGG GCT GTG GCG ATG GCG CTG GGC GTG GAA GAC AAA GTG ACT	339
	Gln Ala Trp Ala Val Ala Met Ala Leu Gly Val Glu Asp Lys Val Thr	
	75 80 85	
40	GTT CCG CTG TTT GAA GGC GTA CAG AAA ACC CAG ACC ATT CGT TCT GCT	387
	Val Pro Leu Phe Glu Gly Val Gln Lys Thr Gln Thr Ile Arg Ser Ala	
	90 95 100 105	
	TCT GAT ATC CGC GAT GTA TTT ATC AAC GCA GGT ATT AAA GGT GAA GAG	435
	Ser Asp Ile Arg Asp Val Phe Ile Asn Ala Gly Ile Lys Gly Glu Glu	
	110 115 120	
45	TAC GAC GCG GCG TGG AAC AGC TTC GTG GTG AAA TCT CTG GTC GCT CAG	483
	Tyr Asp Ala Ala Trp Asn Ser Phe Val Val Lys Ser Leu Val Ala Gln	
	125 130 135	

50

55

5 CAG GAA AAA GCT GCA GCT GAC GTG CAA TTG CGT GGC GTT CCG GCG ATG 531
 Gln Glu Lys Ala Ala Ala Asp Val Gln Leu Arg Gly Val Pro Ala Met
 140 145 150

10 TTT GTT AAC GGT AAA TAT CAG CTG AAT CCG CAG GGT ATG GAT ACC AGC 579
 Phe Val Asn Gly Lys Tyr Gln Leu Asn Pro Gln Gly Met Asp Thr Ser
 155 160 165

AAT ATG GAT GTT TTT GTT CAG CAG TAT GCT GAT ACA GTG AAA TAT CTG 627
 Asn Met Asp Val Phe Val Gln Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Tyr Leu
 170 175 180 185

15 TCC GAG AAA AAA 639
 Ser Glu Lys Lys

20

SEQ ID NO.4:

LÄNGE: 51 Basen

TYP: Nukleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

25

TOPOLOGIE: linear

TTGCAATTAA CAAAGCTTGA ATTCTCGGAG AGAGTAGATC ATGAAAAAGA T 51

30

SEQ ID NO.5:

LÄNGE: 49 Basen

TYP: Nukleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

35

GGGCTTTATG TAAAGCTTGG ATCCTTATTT TTTCTCGGAC AGATATTTT 49

40

Patentansprüche

45

1. Verfahren zur Steigerung der Ausbildung der natürlichen Proteinkonformation bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen durch einen prokaryontischen Wirtsorganismus, der eine rekombinante DNA enthält, die für das sekretierte Protein kodiert, worin man den Wirtsorganismus in einem geeigneten Nährmedium unter geeigneten Bedingungen für die Expression der rekombinanten DNA züchtet,

50

dadurch gekennzeichnet,

daß man ein Nährmedium mit einem Gehalt von 0,1 bis 20 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien verwendet.

55

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß man ein Nährmedium mit einem Gehalt von 1 bis 15 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Nährmedium mit einem Gehalt von 3 bis 12 mmol/l eines oder mehrerer Thiolreagenzien verwendet.
- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man reduzierende Thiolreagenzien mit SH-Gruppen verwendet.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man reduzierende Thiolreagenzien mit einer SH-Gruppe pro Molekül verwendet.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als reduzierende Thiolreagenzien Glutathion (GSH), Cystein, N-Acetylcystein, Cysteamin, β -Mercaptoethanol oder Gemische davon verwendet.
- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Gemisch von reduzierenden Thiolreagenzien mit SH-Gruppen und oxidierenden Thiolreagenzien mit Disulfidgruppen verwendet.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das molare Verhältnis von reduzierenden zu oxidierenden Thiolreagenzien 2:1 bis 20:1 beträgt.
- 30 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Gemisch aus reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) verwendet.
- 35 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für das sekretierte Protein kodierende rekombinante DNA in operativer Verknüpfung mit einem DNA-Fragment steht, das für ein Signalpeptid zum Durchdringen von inneren bakteriellen Membranen kodiert.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Signalpeptid aus dem E.coli OmpA Protein stammt.
- 45 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich die für das sekretierte Protein kodierende rekombinante DNA unter Kontrolle eines induzierbaren Expressionssignals befindet.
- 50 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man dem Nährmedium weiterhin ein oder mehrere Mono- oder/und Oligosaccharide zusetzt, die vom Wirtsorganismus nicht metabolisiert werden können.
- 55 14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein oder mehrere Mono- oder/und Oligosaccharide ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sorbose, Saccharose, Raffinose oder Gemischen davon, verwendet.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in einem Wirtsorganismus zusammen mit der Expression der für das zu sekretierende, disulfid-verbrückte Protein kodierenden rekombinanten DNA eine Überexpression eines Proteindisulfidisomera-

segens durchföhrt.

Claims

- 5 1. Process for increasing the formation of the natural protein conformation when disulfide-bonded proteins are secreted by a prokaryotic host organism that contains a recombinant DNA coding for the secreted protein in which the host organism is cultured in a suitable culture medium under suitable conditions for the expression of the recombinant DNA,
10 **wherein**
a culture medium containing 0.1 to 20 mmol/l of one or several thiol reagents is used.
2. Process as claimed in claim 1,
15 **wherein**
a culture medium containing 1 to 15 mmol/l of one or several thiol reagents is used.
3. Process as claimed in claim 2,
20 **wherein**
a culture medium containing 3 to 12 mmol/l of one or several thiol reagents is used.
4. Process as claimed in one of the claims 1 to 3,
25 **wherein**
reducing thiol reagents with SH groups are used.
5. Process as claimed in one of the claims 1 to 4,
30 **wherein**
reducing thiol reagents with one SH group per molecule are used.
6. Process as claimed in claim 5,
35 **wherein**
glutathione (GSH), cysteine, N-acetylcysteine, cysteamine, β -mercaptoethanol or mixtures thereof are used as the reducing thiol reagents.
7. Process as claimed in one of the claims 1 to 3,
40 **wherein**
a mixture of reducing thiol reagents with SH groups and oxidizing thiol reagents with disulfide groups is used.
8. Process as claimed in claim 7,
45 **wherein**
the molar ratio of reducing to oxidizing thiol reagents is 2:1 to 20:1.
9. Process as claimed in one of the claims 7 to 8,
50 **wherein**
a mixture of reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) is used.
10. Process as claimed in claim 9,
55 **wherein**
the recombinant DNA coding for the secreted protein is operatively linked with a DNA fragment that codes for a signal peptide for penetrating inner bacterial membranes.
11. Process as claimed in claim 10,
wherein
the signal peptide is derived from the E. coli OmpA protein.
12. Process as claimed in one of the claims 1 to 11,
wherein
the recombinant DNA coding for the secreted protein is under the control of an inducible expression signal.
13. Process as claimed in one of the previous claims,

wherein

one or several monosaccharides or/and oligosaccharides which cannot be metabolized by the host organism are additionally added to the culture medium.

- 5 14. Process as claimed in claim 13,
wherein
one or several monosaccharides or/and oligosaccharides selected from the group comprising sorbose, sucrose, raffinose or mixtures thereof are used.
- 10 15. Process as claimed in one of the previous claims,
wherein
an overexpression of a protein disulfide isomerase gene is carried out in a host organism together with the expression of the recombinant DNA which codes for the secreted disulfide-bonded protein.

15

Revendications

1. Procédé pour augmenter la formation de la conformation naturelle des protéines lors de la sécrétion de protéines à ponts disulfure par un organisme hôte procaryotique qui contient un ADN recombinant qui code la protéine sécrétée, dans lequel on cultive l'organisme hôte dans un milieu nutritif approprié dans des conditions appropriées pour l'expression de l'ADN recombinant, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu nutritif ayant une teneur de 0,1 à 20 mmol/l d'un ou plusieurs réactifs thioliques.
- 20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu nutritif ayant une teneur de 1 à 15 mmol/l d'un ou plusieurs réactifs thioliques.
- 25 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu nutritif ayant une teneur de 3 à 12 mmol/l d'un ou plusieurs réactifs thioliques.
- 30 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on utilise des réactifs thioliques réducteurs à groupes SH.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on utilise des réactifs thioliques réducteurs ayant un groupe SH par molécule.
- 35 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on utilise comme réactifs thioliques réducteurs le glutathion (GSH), la cystéine, la N-acétylcystéine, la cystéamine, le β -mercaptoéthanol ou des mélanges de ceux-ci.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on utilise un mélange de réactifs thioliques réducteurs à groupes SH et de réactifs thioliques oxydants à groupes disulfure.
- 40 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le rapport molaire des réactifs thioliques réducteurs aux réactifs thioliques oxydants est de 2:1 à 20:1.
9. Procédé selon l'une des revendications 7 à 8, caractérisé en ce que l'on utilise un mélange de glutathion réduit (GSH) et de disulfure de glutathion (GSSG).
- 45 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'ADN recombinant codant la protéine sécrétée est lié de manière active à un fragment d'ADN qui code un peptide signal pour la traversée des membranes bactériennes internes.
- 50 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le peptide signal provient de la protéine OmpA de E. coli.
12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'ADN recombinant codant la protéine sécrétée se trouve sous le contrôle d'un signal d'expression inductible.
- 55 13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on ajoute en outre au milieu nutritif un ou plusieurs mono- et/ou oligosaccharides qui ne peuvent pas être métabolisés par l'organisme

hôte.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'on utilise un ou plusieurs mono- et/ou oligo-
saccharides choisis dans le groupe consistant en le sorbose, le saccharose, le raffinose ou des mélanges
de ceux-ci.
15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on réalise une surexpression
d'un gène de protéine disulfure isomérase dans un organisme hôte en même temps que l'expression de
l'ADN recombinant codant la protéine à ponts disulfure qui doit être sécrétée.

Fig. 1

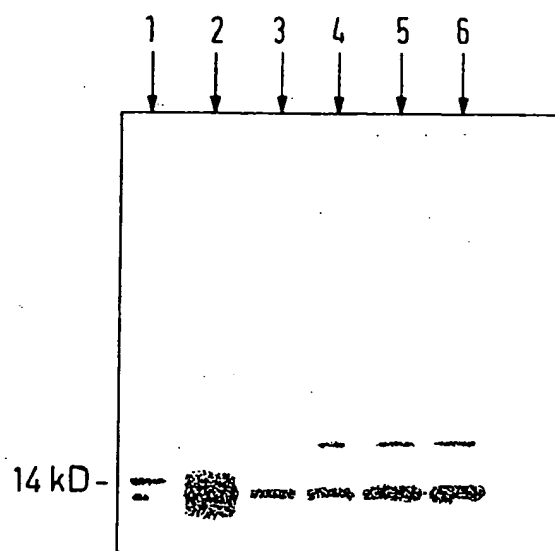


Fig. 2

Expressionsplasmid pRBla1-PDI

